

УДК 579.64:632.3

И. М. Игнатьева, Е. В. Каримова, С. И. Приходько

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр карантина растений»,
140150, Россия, Московская обл., г. Быково, ул. Пограничная, 32,
babiraignirmi@yandex.ru

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ФАСОЛИ *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI* В РАСТИТЕЛЬНОМ И СЕМЕННОМ МАТЕРИАЛЕ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Ключевые слова: бактериальный ожог фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, диагностика, экстракция, ПЦР, праймер.

Цель работы – изучение методов диагностики возбудителя бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (далее *X. a.* pv. *phaseoli*).

В свете государственных задач по продовольственной безопасности и по импортозамещению отечественной растительной продукции проблема бактериозов в Российской Федерации приобретает первостепенное значение.

Бактериозы растений наносят значительный ущерб сельскохозяйственному производству Российской Федерации и сопредельных с ней стран. На сегодняшний день актуальным вопросом является увеличивающийся объем экспорта, при этом отечественная продукция должна соответствовать фитосанитарным требованиям стран-импортеров по определенным показателям, в том числе по отсутствию возбудителей бактериозов.

Возбудитель бактериального ожога фасоли сохраняется на поверхности и внутри семян, на зараженных растительных остатках, на поверхности растений-хозяев. Проникнув в растение, *X. a.* pv. *phaseoli* быстро размножается в межклеточном пространстве.

Возбудитель бактериального ожога фасоли *X. a.* pv. *phaseoli* поражает многие виды растений рода *Phaseolus* [1, 2].

Материалы и методы исследований. В процессе выполнения исследования в лаборатории бактериологии Испытательного Лабораторного Центра ФГБУ «ВНИИКР» использовали растительный материал, полученный при обследовании посевов зернобобовых культур, а также идущий на экспорт семенной материал. В исследовании использовали референтный штамм *X. a.* pv. *phaseoli* CFBP2534 из Французской коллекции бактерий фитопатогенов (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), Париж, Франция).

Экстракцию ДНК проводили с помощью коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя. В исследованиях применяли набор «Проба-ГС» ООО «АгроДиагностика», основанный на сорбционном методе выделения ДНК, а также набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на автоматических станциях TECAN «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол»), основанный на использовании магнитных частиц. Лаборатория оснащена автоматической станцией выделения нуклеиновых кислот TECAN «Freedom EVO» (Швейцария).

Результаты исследований. Нами были оптимизированы состав реакционной смеси и условия амплификации:

– классической ПЦР с праймерами в соответствии с Audy et al. (1995), позволяющей детектировать участок генома р7 *X. a. pv. phaseoli* с помощью прямого X4e (5'-CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG-3') и обратного праймеров X4c (5'-GGC AAC ACC CGA TCC СТА AAC AGG-3'). Ожидаемый размер продукта амплификации составляет 730 п.о. [5, 3];

– классической ПЦР с праймерами в соответствии с Leite Jr. et al. (2008), позволяющей детектировать участок генома hrp *X. a. pv. phaseoli* с помощью прямого RST21 (5'-GCA CGC TCC AGA TCA GCA TCG AGG-3') и обратного праймеров RST22 (5'-GGC ATC TGC ATG CGT GCT CTC CGA-3'). Ожидаемый размер продукта амплификации составляет 1075 п.о. [4].

Амплификацию проводили на амплификаторе ДТ-Прайм (ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ) с последующей детекцией результатов ПЦР методом горизонтального гельэлектрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Одним из основных критериев эффективности теста является аналитическая чувствительность [5]. При сравнении различных методов экстракции ДНК из растительного образца установлено, что оба набора применимы для выделения ДНК при дальнейшей идентификации *X. a. pv. phaseoli* праймерными системами X4e/X4c и RST21/RST22. ПЦР в соответствии с Audy et al. показал более высокую чувствительность (10^2 КОЕ/мл), в отличие от ПЦР в соответствии с Leite Jr. et al. (10^3 КОЕ/мл). Тем не менее оба теста могут быть использованы в диагностике возбудителя бактериального ожога фасоли в качестве отборочных как в симптоматическом, так и бессимптомном растительном и семенном материале.

Список литературы

1. Zamani Z., Bahar M., Jacques M. A. et al. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011. Vol. 27. P. 2371–2378.
2. Popović T., Balaž J., Nikolić Z. et al. // African Journal of Agricultural Research. 2011. Vol. 5(19). P. 2730–2736.
3. Audi P. A., Braat C. E., Saindom G. et al. // Phytopathology. 1996. Vol. 86. P. 361–366
4. Nunes W. M. C., Corazza M. J., Souza S. A. C. D. et al. // Summa Phytopathologia. 2008. Vol. 34 (3). P. 228–231.
5. Игнатьева И. М., Каримова Е. В. Изучение бактериозов возбудителей болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики // Сборник материалов конференции «Современные подходы и методы в защите растений». 2018. С. 193–197.